

#3
RECEIVED
MAR 1 1932
MAR 0 9 2001

Please type a plus sign (+) inside this box → ☐

PTO/SB/21 (08-00)
Approved for use through 10/31/2002 OMB 051-0031
Patent and Trademark Office: U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Valid OMB control number.

O I P E
MAR 0 6 2001
PATENT & TRADEMARK OFFICE

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

TRANSMITTAL FORM (to be used for all correspondence after initial filing)	Application	09/752,957	
	Filing Date	January 2, 2001	
	First Named	David Shiuan	
	Group Art Unit	1632	
	Examiner Name	TBA	
Total Number of Pages in This Submission		Attorney Docket Number	101198-3

ENCLOSURES (check all that apply)		
<input type="checkbox"/> Fee Transmittal Form	<input type="checkbox"/> Assignment Papers (for an Application)	<input type="checkbox"/> After Allowance Communication to Group
<input type="checkbox"/> Fee Attached	<input type="checkbox"/> Drawing(s)	<input type="checkbox"/> Appeal Communication to Board of Appeals and Interferences
<input type="checkbox"/> Amendment / Response	<input type="checkbox"/> Licensing-related Papers	<input type="checkbox"/> Appeal Communication to Group (Appeal Notice, Brief, Reply Brief)
<input type="checkbox"/> After Final	<input type="checkbox"/> Petition	<input type="checkbox"/> Proprietary Information
<input type="checkbox"/> Affidavits/declaration(s)	<input type="checkbox"/> Petition to Convert a Provisional Application	<input type="checkbox"/> Status Letter
<input type="checkbox"/> Extension of Time Request	<input type="checkbox"/> Power of Attorney, Revocation Change of Correspondence	<input type="checkbox"/> Other Enclosure(s) (please identify below):
<input type="checkbox"/> Express Abandonment Request	<input type="checkbox"/> Terminal Disclaimer	
<input type="checkbox"/> Information Disclosure Statement	<input type="checkbox"/> Request for Refund	
<input checked="" type="checkbox"/> Certified Copy of Priority Document(s)	<input type="checkbox"/> CD, Number of CD(s) _____	
<input type="checkbox"/> Response to Missing Parts/ Incomplete Application	Remarks	
<input type="checkbox"/> Response to Missing Parts under 37 CFR 1.52 or 1.53	The certified copy of Taiwan patent application number 089120972 filed Oct. 7, 2000 is enclosed herewith	

SIGNATURE OF APPLICANT, ATTORNEY, OR AGENT	
Firm or Individual name	Bruce S. Londa Norris, McLaughlin & Marcus; 220 East 42nd Street, 30th Floor, New York, NY 100017 Telephone: 212-808-0700
Signature	
Date	March 2, 2001

CERTIFICATE OF MAILING			
I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231 on this date: March 2, 2001			
Typed or printed name	Bruce S. Londa		
Signature		Date	March 2, 2001

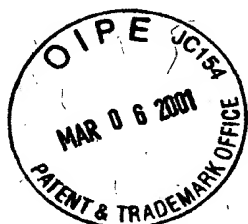
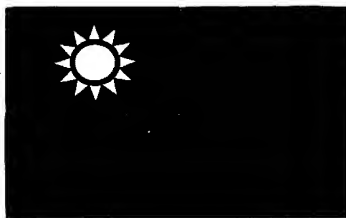
+

Burden Hour Statement: This form is estimated to take 0.2 hours to complete. Time will vary depending upon the needs of the individual case. Any comments on the amount of time you are required to complete this form should be sent to the Chief Information Officer, U. S. Patent and Trademark Office, Washington, DC 20231. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Assistant Commissioner for Patents, Washington, DC 20231.

RECEIVED

MAR 09 2001

TECH CENTER 1600/2900



中華民國經濟部智慧財產局

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE
MINISTRY OF ECONOMIC AFFAIRS
REPUBLIC OF CHINA

茲證明所附文件，係本局存檔中原申請案的副本，正確無訛，
其申請資料如下：

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this
office of the application as originally filed which is identified hereunder:

申請日：西元 2000 年 10 月 07 日
Application Date

申請案號：089120972
Application No.

申請人：行政院國家科學委員會
Applicant(s)

局長
Director General

陳明邦

發文日期：西元 2001 年 2 月 6 日
Issue Date

發文字號：
Serial No.

09011001529

申請日期：	案號：
類別：	

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、 發明名稱	中 文	高生物素含量之酵母及其製備方法
	英 文	
二、 發明人	姓 名 (中文)	1. 宣大衛
	姓 名 (英文)	1.
	國 籍	1. 中華民國
	住、居所	1. 高雄市西子灣蓮海路70號(中山大學)
三、 申請人	姓 名 (名稱) (中文)	1. 行政院國家科學委員會
	姓 名 (名稱) (英文)	1.
	國 籍	1. 中華民國
	住、居所 (事務所)	1. 台北市和平東路二段一〇六號十八樓
	代表人 姓 名 (中文)	1. 翁政義
	代表人 姓 名 (英文)	1.



四、中文發明摘要 (發明之名稱：高生物素含量之酵母及其製備方法)

本發明揭露一種生產高生物素含量的酵母及其製備方法。藉由構築一插入性質體，其帶有一生物素合成酶基因、一協助質體DNA插入的DNA序列、啟動子以及標記基因；此質體可將上述序列重組至酵母菌之染色體DNA中，藉此產生穩定的酵母轉形株，並可大量的產生生物素。

英文發明摘要 (發明之名稱：)



本案已向

國(地區)申請專利

申請日期

案號

主張優先權

無

有關微生物已寄存於

寄存日期

寄存號碼

食品工業發展研究所

2000/06/20

CCRC 940296

食品工業發展研究所

2000/06/20

CCRC 940297

食品工業發展研究所

2000/06/20

CCRC 940298

食品工業發展研究所

2000/06/20

CCRC 940299

食品工業發展研究所

2000/06/20

CCRC 940300

食品工業發展研究所

2000/06/20

CCRC 940301

食品工業發展研究所

2000/06/20

CCRC 940302



五、發明說明 (1)

發明領域

本發明係有關於以食用酵母為宿主表現生物素的方法，特別是有關於利用遺傳工程，使食用酵母表現高量生物素的方法。

發明背景

生物素 (biotin ; 2-酮基-3,4-咪唑烷基-2-四氫噻吩-正-戊酸)，又稱做維生素H，自從1936年被Kogl及Tonuis自蛋黃中分離出來（曾被稱為酵母生長激素），其構造、功能及生化反應機轉都被熱烈的研究過。一般而言，生物素在細胞中扮演一個共價結合的二氧化碳載體 (CO_2 carrier) 之角色，是許多羧化酶 (carboxylase)、脫羧酶 (decarboxylase) 及轉羧基酶 (transcarboxylase) 作用的輔酶。

在過去三十年間，從傳統遺傳學及分子遺傳學的研究，使得大腸桿菌 (*E. coli*) 的生物素生化合成路徑及其相關基因都被確認。大腸桿菌的生物素操縱組 (bio operon) 之構造及調控情形已被徹底的研究 (Shiuan, D. 等人, *Gene* (1994) 145: 1-7)，此操縱子位於大腸桿菌遺傳圖譜的第17分鐘上，包括生物素生化合成步驟中五種關鍵酵素的基因（參見第1圖）。bioABFCD操縱組

(operon) 的五個基因之轉錄，是由位在bioA及bioB之間的一個管制序列所控制。這個管制序列包括了此操縱組的操縱子 (operator)，並與bioA及bioB基因之啟動子 (promotor) 有部份重合，而bioA基因及bioBFCD基因則



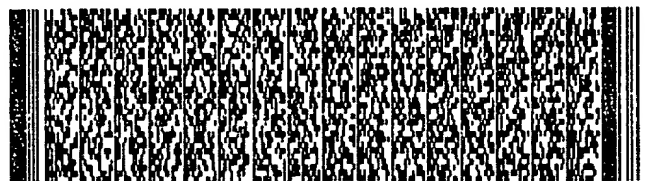
五、發明說明 (2)

分別向兩個方向進行轉錄。

在大腸桿菌的遺傳圖譜的第89分鐘位置，另有birA基因，其基因產物即是生物素操縱子的抑制子 (repressor)。生物素操縱子的轉錄需要抑制子及共同抑制子 (即生物素基-5'-腺嘌呤核苷酸，biotinyl-5'-adenylate)，一起與操縱子作用方能完成抑制作用。而生物素基-5'-腺嘌呤核苷酸是經由birA基因產物 (為bio抑制子，其另一功能是生物素全酵素合成酶biotin holo enzyme synthetase) 將生物素活化而成。

在酵母方面，目前已知釀酒酵母*Saccharomyces cerevisiae*有BI02 (編碼生物素合成酶)、BI03 (編碼7, 8-二胺基壬酸轉胺酶) 以及BI04 (編碼脫硫生物素合成酶) 三種生化合成基因，分別相當於大腸桿菌的bioB、bioA及bioD基因。亦即，釀酒酵母*S. cerevisiae*生物素的生化合成的末三個步驟與大腸桿菌相同，而前面兩個步驟則可能不同，而無法自簡單之碳源產生生物素。此外，最近發現*S. cerevisiae*有一個BI05基因，其產物與維生素的攝取有關，故稱為生物素通透酶 (biotin permease)

(Phalip, V. 等人, *Gene* (1999) 232: 43-51)。在食用酵母*Candida utilis*方面，至今對其生物素的生化合成步驟尚不了解，亦無任何相關基因或酵素被解析。僅知釀酒酵母須添加生物素才容易生長，而食用酵母則不必添加生物素即可生長，顯示食用酵母具備可從簡單的碳源自行合成生物素的能力。



五、發明說明 (3)

大多數生物均需要生物素以維持生長，只有少數生物的能自行合成生物素。雖然在人類及動物方面，缺乏生物素的情形並不普遍，但是在某些遺傳疾病或營養不均衡的條件下，缺乏生物素常導致十分嚴重的後果。例如，缺乏全羧化酶合成酶 (holocarboxylase synthase) 的嬰兒，通常在出生的頭一天，即會產生持續的嘔吐、氣喘等症狀；缺乏生物素酶 (biotindase) 的嬰兒，則可能等到二、三歲才會顯出皮膚、眼部及泌尿系統的病症。在過去十多年來，生物素也逐漸被發現與許多商業化大量飼養農場動物的許多問題有關。比較顯著的是在家禽方面，有雞的脂肪肝及腎症狀 (FLKS)、猝死症 (ADS) 等。在室內密集飼養豬隻一直令人困惑的跛足病，在1977年亦被發現與缺乏生物素有關。因此，過去數年，國際市場上生物素的需求量，以每年增加15%的速度持續成長，其中60-80%是用作動物飼料的添加物。

在習知的技術上，生物素均是以化學合成的方法生產，其目的是可獲得高純度的結晶狀生物素，以作為藥品之用途。但產物的分離、純化則相當複雜。再者，習知技術中，以遺傳工程生產重要化合物的方法，一般都是使用傳統的複製型質體 (replicative plasmid)，多半需要藉助抗生素來穩定其複製數 (copy number)，不適於長期的發酵過程，亦不適於製造食品及飼料。另一方面，開發一種高生物素含量之酵母，有其市場之需要，可用以作為飼料、食品添加物或化妝品之原料。由於食用酵母本身



五、發明說明 (4)

即為傳統之食品及飼料，故本發明所生產的高生物素含量之酵母，可省去複雜的化學純化步驟，在發酵、分離及乾燥後，就可直接成為商品。並且，以插入性質體

(integrated plasmid) 取代複製型質體，將相關的基因轉殖到酵母染色體中，即可得到穩定的生產菌株，此即為本發明之目的及優點。

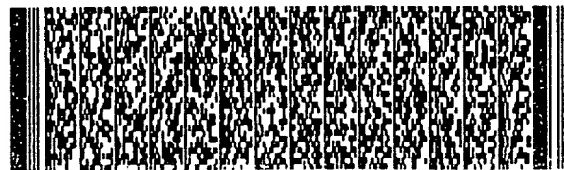
發明概述

本發明之目的是提供一用於食用酵母之插入性質體 (integrated plasmid)，包括一生物素合成酶基因、一協助質體DNA插入的DNA序列、一啟動子及一標記基因。此質體之構築可將生物素生化合成之主要基因帶至酵母菌染色體DNA上，以生產高生物素含量之酵母。

本發明的另一目的是提供一種製備高生物素含量的食用酵母之方法，此方法包括下列步驟：(a) 構築一插入性質體，其包括一生物素合成酶基因、一協助質體DNA插入的DNA序列、一啟動子及一標記基因；(b) 將該插入性質體線形化；(c) 將該線形化之插入性質體轉殖至酵母；以及 (d) 使該生物素合成酶基因與該酵母染色體進行重組作用。

本發明的另一目的，係提供一種利用高生物素含量的食用酵母生產生物素之方法，該方法包括將本發明所製備的高生物素含量之食用酵母，在一適當環境下培養並回收利用。

為了讓本發明之上述和其他目的、特徵，及優點能更



五、發明說明 (5)

明顯易懂，下文特舉較佳實施例並配合所附圖示，做詳細說明如下。

圖示之簡單說明

第1圖顯示大腸桿菌 (*E. coli*) 之生物素生化合成基因之構造及調控圖。

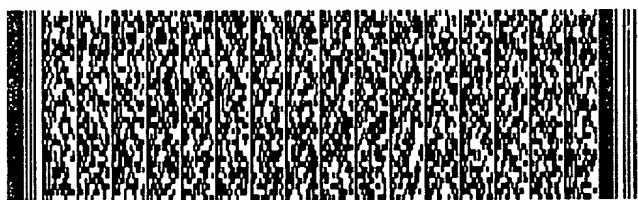
第2圖顯示質體pMS3之構築流程。此質體包括下列片段：*S. cerevisiae*的乙醇去氫酶啟動子 (pADH1) 以表現 *S. cerevisiae* 的BI02基因、突變的L41作為抗環亞胺己酮 (cycloheximide) 的標記基因以及 *C. utilis* 的18s rDNA序列。

第3圖顯示質體pMC6之構築流程。此質體包括下列片段：*C. utilis*核糖體蛋白L41之啟動子pL41以及 *S. cerevisiae* 的生物素合成酶BI02基因。

第4圖顯示質體pMC9之構築流程。此質體包括下列片段：*C. utilis*核糖體蛋白L41之啟動子pL41以表現 *S. cerevisiae* 的BI02基因、突變的L41作為抗環亞胺己酮的標記基因以及 *C. utilis* 的18s rDNA序列。

第5圖顯示質體pMCC11之構築流程。此質體包括下列片段：*C. utilis*核糖體蛋白L41之啟動子pL41以及 *C. utilis* 的生物素合成酶BI02基因。

第6圖顯示質體pMCC21之構築流程。此質體包括下列片段：*C. utilis*核糖體蛋白L41之啟動子pL41以表現 *C. utilis* 的BI02基因 (編碼204個胺基酸)、突變的L41作為抗環亞胺己酮的標記基因以及 *C. utilis* 的18s rDNA序



五、發明說明 (6)

列。

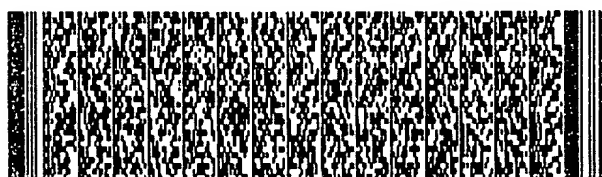
第7圖顯示質體pMCC-E13之構築流程。此質體包括下列片段：E. coli的pTac基因啟動子以及C. utilis的生物素合成酶BIO2基因。

第8圖顯示本發明之質體pMCC31S之構築。此質體包括下列片段：C. utilis核糖體蛋白L41之啟動子pL41、C. utilis的生物素合成酶BIO2基因（編碼233個胺基酸，為完整之BIO2蛋白）、C. utilis的18s rDNA序列以及突變的L41作為抗環亞胺己酮的標記基因。

第9圖顯示本發明之質體pMCC32H之構築。此質體包括下列片段：C. utilis核糖體蛋白L41之啟動子pL41、C. utilis的生物素合成酶BIO2基因、C. utilis的HIS3基因片段（0.5 kb）以及突變的L41作為抗環亞胺己酮的標記基因。

第10圖顯示本發明之質體pMCC33U之構築。此質體包括下列片段：C. utilis核糖體蛋白L41之啟動子pL41、C. utilis的生物素合成酶BIO2基因、C. utilis的URA3基因片段（0.59及0.50 kb）以及突變的L41作為抗環亞胺己酮的標記基因。

第11圖顯示本發明之質體pMCC35U之構築。此質體包括下列片段：C. utilis核糖體蛋白L41之啟動子pL41、C. utilis的生物素合成酶BIO2基因、C. utilis的URA3基因片段（0.59及0.50 kb）以及突變的L41作為抗環亞胺己酮的標記基因。



五、發明說明 (7)

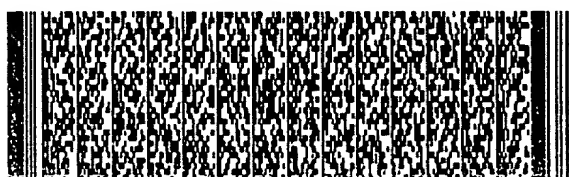
第12圖顯示本發明之質體pMCC36H之構築。此質體包括下列片段：C. utilis核糖體蛋白L41之啟動子pL41、C. utilis的生物素合成酶BIO2基因、C. utilis的HIS3基因片段（0.54及0.44 kb）以及突變的L41作為抗環亞胺己酮的標記基因。

第13圖顯示本發明之質體pMCC38S之構築。此質體包括下列片段：C. utilis核糖體蛋白L41之啟動子pL41、C. utilis的生物素合成酶BIO2基因、C. utilis的18s rDNA基因片段（0.54及1.75 kb）以及突變的L41作為抗環亞胺己酮的標記基因。

發明詳述

根據本發明設計之用於食用酵母的插入性質體（例如，pMCC21、pMCC31S、pMCC32H、pMCC33U、pMCC35U、pMCC36H、pMCC38S；第6、8-13圖），其至少包括一生物素合成酶基因、一協助質體DNA插入的DNA序列、一啟動子以及一標記基因。其中，BIO2基因可用於表現食用酵母之生物素合成酶，係選擇自釀酒酵母Saccharomyces cerevisiae或食用酵母Candida utilis之生物素合成酶基因（具有如序列辨識編號：1之核苷酸序列）。此酵素的功​​能為催化生物素生化合成反應的最後一個步驟，此食用酵母BIO2基因為本發明所選殖並定序的生物素生化合成關鍵基因，其方法詳見實施例2。

在本發明之插入性質體中，均包括協助質體插入並進行同源重組之DNA序列，例如，18s核糖體DNA（rDNA）序



五、發明說明 (8)

列，其為食用酵母 *Candida utilis* 的 1.7 仟鹽基 (kb) 之 *Nsi*I-*Bam*HI 18s rDNA 片段。在其他具體實施例中，此 18s rDNA 序列是以 *URA3* 及 *HIS3* 之 DNA 片段 (選殖自 *C. utilis* 染色體) 取代，其效用均為使本發明之質體能順利插入宿主細胞 (食用酵母) 之染色體 DNA 中。

在本發明之插入性質體中，所使用的啟動子是選擇自 *S. cerevisiae* 的乙醇去氫酶啟動子 (*pADH1*) 啟動子或 *C. utilis* 的 *L41* 基因啟動子 (*pL41*)；其中，*pL41* 啟動子是目前極少數詳知之 *C. utilis* 啟動子。

在本發明之插入性質體中，所使用的標記基因是選擇自 *C. utilis* 的突變 *L41* 基因，其可表現突變的 *L41* 核糖體蛋白質，此蛋白質具有抗環亞胺己酮 (*cycloheximide*；*CYH*) 的特性，故培養酵母菌時可藉由抗環亞胺己酮來篩選完成基因重組之食用酵母 (Kondo, K. 等人, *J. Bacteriol.* (1995) 177: 7171-7177)。

熟悉於此技藝者應了解，上述協助質體插入並進形同源重組之 DNA 序列、啟動子及標記基因等片段，可用其他類似之相關序列加以取代，而不影響所要表現之生物素合成酶。因此，上述之實例僅為舉例說明，而非用以限制本發明。

根據本發明的另一形態，係提供一種高生物素含量酵母之製備方法，包括下列步驟：將本發明所構築之插入性質體線形化；將此線形化之插入性質體，藉由電穿孔等方法轉殖至酵母中；以及使生物素合成酶基因與酵母染色體



五、發明說明 (9)

進行重組作用，藉此得到具有高生物素含量之酵母。上述線形化以及轉殖等之方法，均為熟悉遺傳工程及分子生物學領域者所熟知。

本發明更包括將上述方法所製備之具有高生物素含量之酵母，在一適當的環境下培養，使其大量表現生物素。由於酵母為傳統之食品及飼料，因此，根據本發明之方法所大量生產的生物素，可經過純化或不經過純化，而直接使用，其用途包括，但並不限於，直接作為動物飼料添加物、直接作為健康食品或作為各種化妝品的原料等。

本發明所構築之插入性質體，已於89年6月20日，寄存於中華民國食品工業發展研究所菌種中心，寄存編號分別為：pMCC21，CCRC 940296；pMCC31S，CCRC 940297；pMCC32H，CCRC 940298；pMCC33U，CCRC 940299；pMCC35U，CCRC 940300；pMCC36H，CCRC 940301；以及pMCC38S，CCRC 940302。

本發明將藉由以下的實施例而作更進一步地詳細說明，但這些實施例僅是作為舉例說明，而非用以限定本發明之範疇。

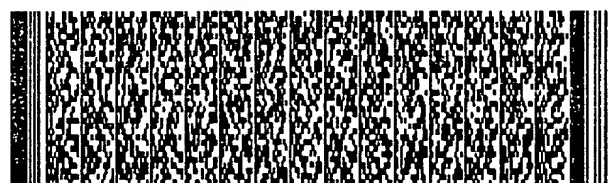
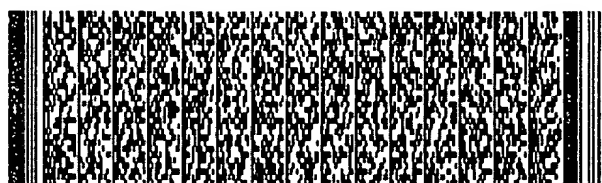
實施例1：S. cerevisiae之BI02基因的選殖

依照S. cerevisiae Y266之BI02基因序列，設計PCR引子（含選殖用之SalI序列）：

(1). 5'-GAAAGTCGACTCAAGATCTGTCGTACTTAA-3'；

(2). 5'-CCGCAGTTAAATCG'ACAACGTG'-3'，

以PCR方法，取得S. cerevisiae之BI02基因的DNA片段。



五、發明說明 (10)

實施例2：C. utilis之BI02基因的選殖與定序

比較S. cerevisiae、E. coli、E. herbicola等五種微生物之生物素合成酶基因序列，發現兩處高保留性之胺基酸序列。分別設計簡併引子 (degenerate primers)：

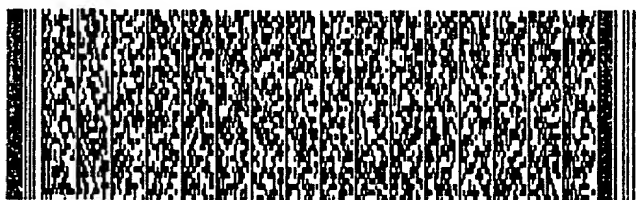
(1). 5'-TGTNCNGARGAYTGAYAANTATTG-3'；

(2). 5'-GTRTCNANRTTTRTG' GTTGTA-3'

其中，Y=T+C，R=A+G'。經PCR反應，自食用酵母染色體DNA中取得約0.3 kb之片段，再以此片段為探針，自食用酵母基因庫 (lambda EMBL3為載體，自備之基因庫) 篩選。

所選殖之C. utilis之生物素合成酶基因 (GenBank accession No:AF212161；序列辨識編號：1)，具有如下之核苷酸序列：

```
                                atgtcgtttatattgac
tgcctattagtcgtccgattgctctttccacttctagagtagcttctagggctactciggcaacagggtgc
tactgctgctgcggagatcttggagatgtgttcacggaacaaatgggaagaagtggcttcacaggagaa
gaagccaaacccattggaatatgcatgtgtcagtgaagacaccagtcacacccctggaccaangaagaat
taaagctatatatgacacaccactcattggacttgatgcactatgtctcagggtgcacacagaagggtcca
acaaccttcagagggtcaattgtgcactcttatgaatatcaaaactgggtgggtgtaccgaggactgtaa
gtactgtgcccattcacagcgttacaacactgggtgtcaaggctgaaagaatcatccaagttgatgagggt
gattgaagctgcuaaggaggcuaaggccaattggatctacaagggtctgtatgggtgtctgtctggagaga
gatgaaaggtagaaagtcacacttgaagaaaatcaagagatgatcactgcctgtccatgaccttggaaat
ggagagttgtgtcaccctgggaattggttgataaagaccaagccactgaattgaaaagtgtctgggtgtac
ggcgtacaaccataacattgatacttacaaggaacactatccaaagggtgatctccacaagaagcttga
tgatagattgaaaacattcaaaaacgttcaaggatctggattaaaggcatgcacagggtggtattcttgg
tcttgggtgagacccaagaggaccgtgtatcttccctctacaccttggccacaattggatcagcatccaga
gtctcttccaatcaacagactgggtcccaatcaagggcacgccaatgtatgaagaagttagaacaagca
agttgaagttgatgagattgtcagaaccttgcctactgcaugattgggtcatgccaaacgtctattatcag
attggctgcaggaagatatacaatgaaagaggcagaacagggtgatgtgtcttcatggctgggttgtaatgc
catcttcacaggtaagaaaatgtctacacaacatgtgtlaacggctgggatgaggataaagccatgttggc
taaatgggggtctgaaccaattggagagtttcaaatacaaccaaggagggttgcattcgggtgtctga
```



五、發明說明 (11)

實施例3：將*C. utilis*之BI02基因組合至*E. coli*表現質體pQE30

將質體pMCC11經NcoI作用，質體pQE30經BamHI作用後，均以Klenow片段補齊，再用SalI切割。取質體pMCC11之NcoI/Klenow-SalI片段（即BI02基因），嵌入pQE30之BamHI/Klenow-SalI片段，即得質體質體pMCC-E13（第7圖）。可藉由大腸桿菌之pTac啟動子，以譯讀架內接合（in frame fusion；載體上原本就設計有幾個胺基酸）的方式表現*C. utilis*之BI02基因。

實施例4：*C. utilis*之生物素合成酶在*E. coli*之功能測試

C. utilis BI02酵素在大腸桿菌基因表現系統中，經異丙基硫代半乳糖苷（IPTG）誘導後，以硫酸十二酯鈉-聚丙烯醯胺膠體電泳（SDS-PAGE）檢驗其分子量大小。而BI02所編碼之生物素合成酶活性則以互補實驗加以驗證（Zhang, S. 等人，Arch. Biochem. Biophys. (1994) 309: 29-35；Hwang, S. Y. 等人，J. Biochem. Biophys. Methods (1999) 39: 111-114）。取質體pMCC-E13轉殖進*E. coli* DH5 α 與*E. coli* R901 (Δ bio) 兩株菌株。將*E. coli* DH5 α (pMCC-E13) 經IPTG誘導後，在SDS-PAGE得一40仟道耳吞（kDa）的蛋白質，與所推測的蛋白質分子量相符。互補實驗則將*E. coli* R901 (pMCC-E13) 培養在最低營養要求培養基上（添加脫硫生物素基質；DTB），結



五、發明說明 (12)

果顯示 *E. coli* R901 (pMCC-E13) 可生長，而對照組 *E. coli* R901 不能生長。此結果證明實施例2取得之 *C. utilis* BI02 基因正確，並且具有酵素活性（不論是不完整的204個胺基酸，或完整之233個胺基酸）。

實施例5：將 *S. cerevisiae* 之BI02基因組合至插入性質體之構築

取上述之 *S. cerevisiae* BI02 基因的PCR產物，以 NdeI-SalI 切割後，將 pALps1 質體也以 NdeI-SalI 處理（條件同上）。將處理過之BI02基因片段與 pALps1 質體，在16℃進行連接作用（ligation）16小時，使BI02基因嵌入 pALps1 質體，得到質體 pMS3（第2圖）。此時的質體 pMS3 包括 *S. cerevisiae* 的乙醇去氫酶啟動子（pADH1）以表現 *S. cerevisiae* 的BI02基因、突變的L41作為標記基因以及 *C. utilis* 的18s rDNA 序列。

另將 *C. utilis* L41 啟動子（pL41）之PCR產物，經 NdeI 與 NcoI 切割後，與 NdeI-NcoI 處理的 pQE30 質體（QIAGEN 公司；如附件A），在16℃進行連接作用16小時，使 pL41 基因嵌入 pQE30 質體，得到質體 pMC5。再將質體 pMC5 以 NcoI 切割後，經 Klenow 片段修補缺口，將BI02基因PCR反應後的產物嵌入 pMC5 的 NcoI-SalI 片段中，得質體 pMC6（第3圖），此即為含有 *C. utilis* 啟動子以表現 *S. cerevisiae* 的BI02基因之插入性質體。

取 pMC6 之 NcoI-SalI 片段（即 pL41-BI02），以相同的連接作用條件（以下同）嵌入質體 pALps1 中，得到質體



五、發明說明 (13)

pMC7。再將pMC7之EcoRV-NdeI (即*S. cerevisiae* pADH1 啟動子區域) 移除後, 得到質體pMC9 (第4圖)。質體pMS3與質體pMC9分別使用*S. cerevisiae*的pADH1啟動子及*C. utilis*的啟動子, 以調控*S. cerevisiae*的BI02基因, 並且兩者都是可嵌入*C. utilis*的插入性質體。

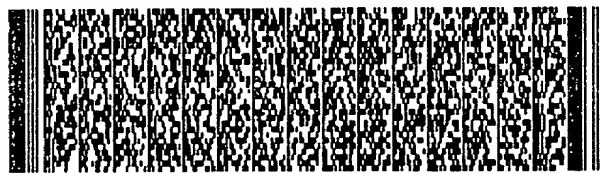
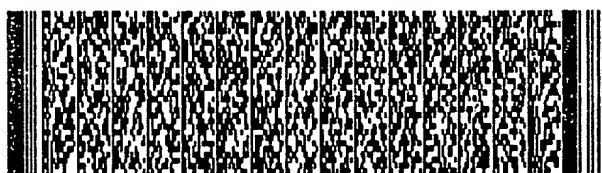
實施例6: 將*C. utilis*之BI02基因組合至插入性質體之構築

將上述實施例2之*C. utilis*之BI02基因, 設計攜有適當切位之引子, 經PCR取得並以NdeI-SalI切割後, 藉由連接作用嵌入pMC5, 即得質體pMCC11 (參見第5圖)。之後, 如第6圖所示, 取質體pMCC11之NdeI-SalI片段 (其NdeI缺口經Klenow片段補齊, 即為pL41-BI02片段)。將此NdeI-SalI片段嵌入質體pMC9, 得質體pMCC15。為填補此構築過程遺失之L41基因片段, 將質體pMC9之BamHI-EcoRI片段取出 (即L41基因片段), 經Klenow片段修補缺口後, 嵌入pMCC15質體之SalI位置, 得到質體pMCC21。此時的質體pMCC21上包括有*C. utilis*的pL41啟動子 (pL41) 以表現*C. utilis*的BI02基因、突變的L41作為標記基因以及*C. utilis*的18s rDNA序列。

實施例7: 其他插入性質體之構築

其他插入性質體, 例如pMCC31S、pMCC32H、pMCC33U、pMCC35U、pMCC36H及pMCC38S之構築, 分別簡要圖示於第9-13圖。

實施例8: *C. utilis*之轉殖與搖瓶發酵測試

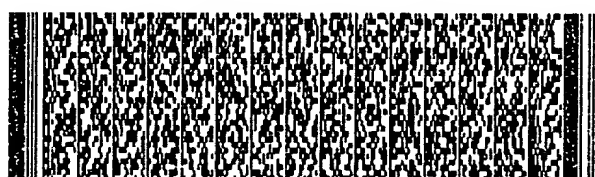


五、發明說明 (14)

將質體pMC9以NcoI線形化(linearize)之後，以電轉殖(electroporation)的方式使質體pMC9進入*C. utilis*，所得之轉形株命名為m9-101、m9-102等(其*S. cerevisiae*之BI02基因受pL41啟動子所調控)。另外將質體pMCC21以SacI線形化之後，依上述方法得轉形株，命名為m21-101、m21-102等(其*C. utilis*之BI02基因受pL41啟動子所調控)。

經過質體pMC9及pMCC21轉殖食用酵母*C. utilis*之後，在培養皿上取得轉形株m9-101 ~ m9-107及m21-101 ~ m21-106，在YPD培養液中(或YPD加上40微克/毫升之環亞胺己酮)培養72小時後分析。先以French press (12,000磅/平方公分)打破細胞後，再以競爭性酵素連結免疫吸附分析法(ELISA)分析其生物素含量。

結果如表1所示，野生型(WT)酵母除去YPD原有的生物素含量(23 ng/ml)之後，僅額外生成8.2 ng/ml的生物素。轉殖酵母m9及m21之各轉形株，其生物素含量均大幅提升。各轉形株間之差異，可能與插入的複製數(copy number)不同，而造成生長速率及生物素含量的差異有關。平均而言，m9轉形株之整體生物素含量約為860 ng/ml，而m21轉形株則約為720 ng/ml，分別相當於野生型酵母生物素含量的103倍及87倍。



五、發明說明 (15)

表1：食用酵母*C. utilis*轉形株之生物素含量分析

	培養液				細胞萃取物		培養方式
	OD _{600nm}	YPD (ng/ml)	OD _{600nm}	YPD(CYH) (ng/ml)	YPD (ng/ml)	YPD(CYH) (ng/ml)	
YPD		23					
WT	8.72	26			5.3		
M9-101	9.05	860	8.04	660	66	63	錐瓶(50 毫升)
M9-102	8.75	760	2.28	714	86	7.3	錐瓶(50 毫升)
M9-103	5.12	920					試管(3 毫升)
M9-104	8.40	1010					試管(3 毫升)
M9-105	8.90	900					試管(3 毫升)
M9-106	6.00	750					試管(3 毫升)
M9-107	5.96	460					試管(3 毫升)
M21-101	8.44	600	2.56	620	98	6	錐瓶(50 毫升)
M21-102	6.28	802	4.72	964	111	13	錐瓶(50 毫升)
M21-103	3.60	420					試管(3 毫升)
M21-104	8.54	720					試管(3 毫升)
M21-105	8.38	430					試管(3 毫升)
M21-106	4.86	560					試管(3 毫升)

註：m9-x 表示*C. utilis* (pMC9，含有pL41及*S. cerevisiae* B102 基因)

m21-x 表示*C. utilis* (pMCC21，含有pL41及*C. utilis* B102 基因)

綜言之，本發明利用插入性質體，將分離之生物素生化合成關鍵基因大量插入酵母染色體之核糖體DNA (rDNA) 或URA3或HIS3等DNA區域，在適當的調控下，可達到大量生產生物素的目的；並且，所得的高生物素含量之酵母，可節省分離、純化等的步驟，而直接應用於動物飼料、健康食品及化妝品原料等用途。



五、發明說明 (16)

雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟悉此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍，當視後附之申請專利範圍而所界定者為準。



六、申請專利範圍

1. 一種酵母插入性質體，其包括一生物素合成酶基因、一協助質體DNA插入的DNA序列、一啟動子以及一標記基因。

2. 如申請專利範圍第1項所述之插入性質體，其中該生物素合成酶基因為*Saccharomyces cerevisiae*或*Candida utilis*之生物素合成酶基因。

3. 如申請專利範圍第2項所述之插入性質體，其中該*Candida utilis*之生物素合成酶基因具有序列辨識編號：1之核苷酸序列，其DNA序列如下：

atgctggtttatattgac
tgcctattagtcgtccgattgctctttccacttctagagtagcttctagggctactctggcaacagggtgc
tactgctgctgcgagatcttggagatgtgttccaggaacaaatggaagaagtggtctcacaggagaa
gaagccaaacccattggaatatgcaattgtcagtgaaagacaccagtcacacctggaccaagaagaat
taaagctatatatgacacaccactcatggacttgatgcactatgctcagggtgcaacacagaagggtcca
acaaccttcagagggtcaattgtgcactcttatgaatatcaaacctgggtgggtgtaccgaggactgtaa
gtactgtgccaatcacagcgttacaacactgggtgcaaggctgaaagaatcaccaggtgatgagggt
gattgaagctgcaaggagggaaggccaatggatctacaagggtctgtatgggtgctgcttggagaga
gatgaaaggtagaaagtcacacttgaagaaaatcaagagatgatcactgctgctccatgaccttggaa
ggagaggtgtgtcaccctgggaatgggttgataaagaccaagccactgaattgaaaagtgctgggttgac
ggcgtacaaccataacattgatacttacaaggaacactatccaaagggtgatctccacaagaagcttga
tgatagattgaaaacattcaaaaacgttcaaggatctggattaaaggcatgcacagggtgggtattcttgg
tcttgggtgagaccaagaggaccgtgtatcttccctctacaccttggccacaatggatcagcatccaga
gtctcttccaatcaacagactggttccaatcaagggcacgccaatgtatgaagaagtaagaacaagca
agttgaagttgatgagattgtcagaaccttgcctactgcaugattgggtcatgccaacgtctattatcag
attggctgcaggaagatatcaatgaaagaggcagaacagggtgatgtgcttcatggctgggttgaatgc
catcttcacaggtaagaaaatgctcacaacaatgtgtaacggctgggatgaggataaagccatgttggc
taaatgggggtctgaaaccaatggagaggttcaaatacaaccaaggagggttgcatctgggtgcttga



六、申請專利範圍

4. 如申請專利範圍第1項所述之插入性質體，其中該協助質體DNA插入的DNA序列係擇自*Candida utilis*之NsiI-BamHI 18s rDNA片段、URA3 DNA片段及HIS3 DNA片段所組成的族群中。

5. 如申請專利範圍第1項所述之插入性質體，其中該標記基因為抗環亞胺己酮之標記基因。

6. 如申請專利範圍第1項所述之插入性質體，其中該啟動子為*Candida utilis*的pL41啟動子或*Saccharomyces cerevisiae*的pADH1啟動子。

7. 如申請專利範圍第1項所述之插入性質體，係擇自以下所組成的族群中：

(i) pMCC21 (具有如第6圖所示之構築，寄存編號CCRC 940296，中華民國89年6月20日)；

(ii) pMCC31S (具有如第8圖所示之構築，寄存編號CCRC 940297，中華民國89年6月20日)；

(iii) pMCC32H (具有如第9圖所示之構築，寄存編號CCRC 940298，中華民國89年6月20日)；

(iv) pMCC33U (具有如第10圖所示之構築，寄存編號CCRC 940299，中華民國89年6月20日)；

(v) pMCC35U (具有如第11圖所示之構築，寄存編號CCRC 940300，中華民國89年6月20日)；

(vi) pMCC36H (具有如第12圖所示之構築，寄存編號CCRC 940301，中華民國89年6月20日)；以及

(vii) pMCC38S (具有如第13圖所示之構築，寄存編



六、申請專利範圍

號CCRC 940302，中華民國89年6月20日)

8. 一種高生物素含量酵母之製備方法，包括：

(a) 構築一插入性質體，其包括一生物素合成酶基因、一協助質體DNA插入的DNA序列、一啟動子及一標記基因；

(b) 將該插入性質體線形化；

(c) 將該線形化之插入性質體轉殖至酵母；以及

(d) 使該生物素合成酶基因與該酵母染色體進行重組作用。

9. 如申請專利範圍第8項所述之製備方法，其中該生物素合成酶基因為*Saccharomyces cerevisiae*或*Candida utilis*之生物素合成酶基因。

10. 如申請專利範圍第9項所述之製備方法，其中該*Candida utilis*之生物素合成酶基因具有序列辨識編號：1之核苷酸序列。

11. 如申請專利範圍第8項所述之製備方法，其中該協助質體DNA插入的DNA序列係擇自*Candida utilis*之NsiI-BamHI 18s rDNA片段、URA3 DNA片段及HIS3 DNA片段所組成的族群中。

12. 如申請專利範圍第8項所述之製備方法，其中該標記基因為抗環亞胺己酮之標記基因。

13. 如申請專利範圍第8項所述之製備方法，其中該啟動子為*Candida utilis*的pL41啟動子或*Saccharomyces cerevisiae*的pADH1啟動子。



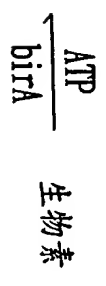
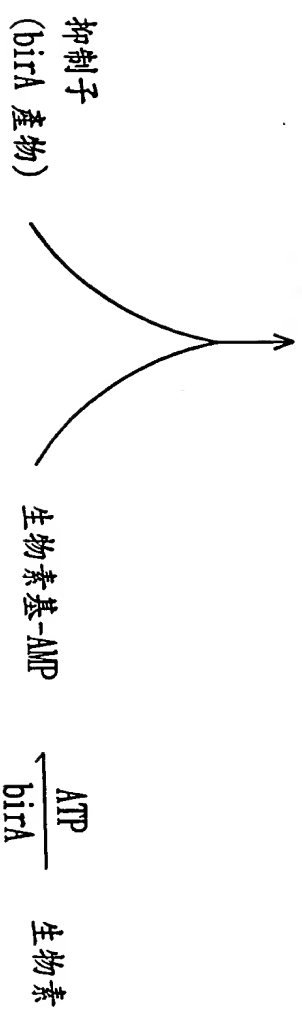
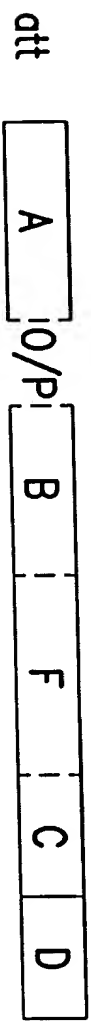
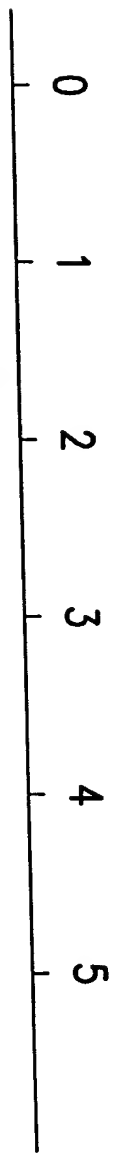
六、申請專利範圍

14. 如申請專利範圍第8項所述之製備方法，其所製得的高生物素含量食用酵母，可應用於飼料添加物、食品添加物或化妝品之原料。

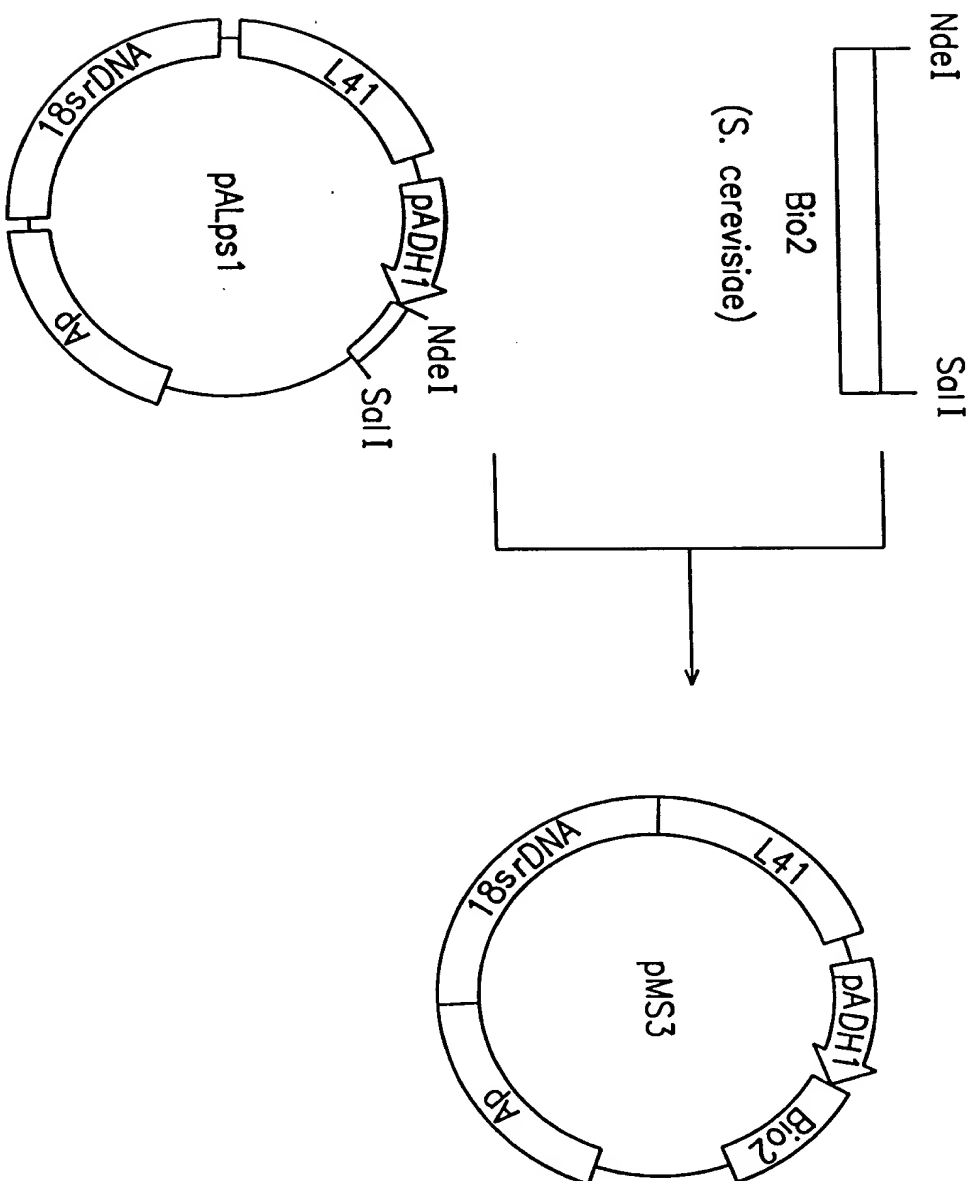
15. 一種利用高生物素含量的食用酵母生產生物素之方法，該方法包括將一高生物素含量之食用酵母，其由申請專利範圍第8項所述之方法而製備，在一適當環境下培養並回收。

16. 如申請專利範圍第15項所述之方法，其所生產的生物素，可應用於飼料添加物、食品添加物或化妝品之原料。

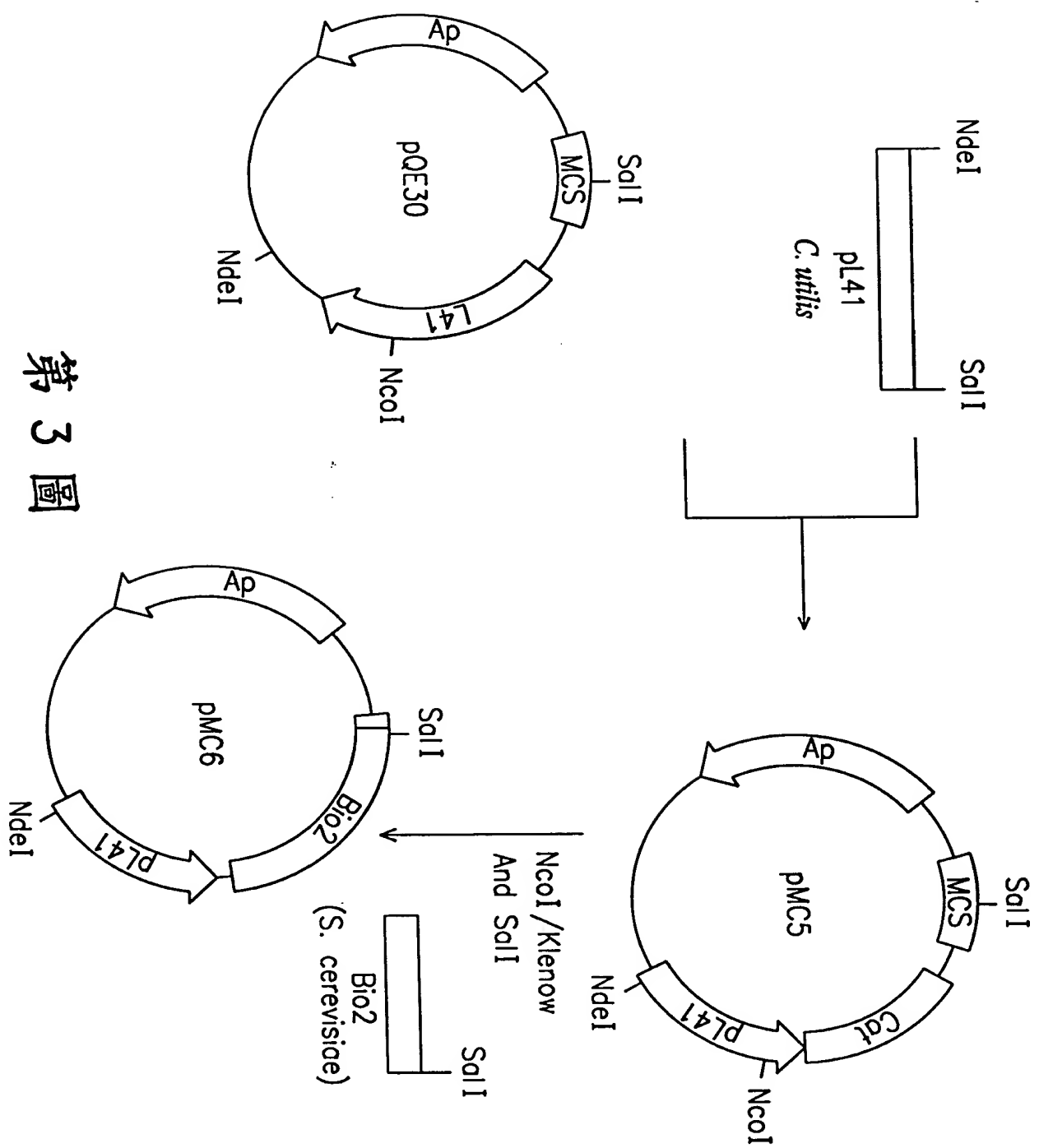




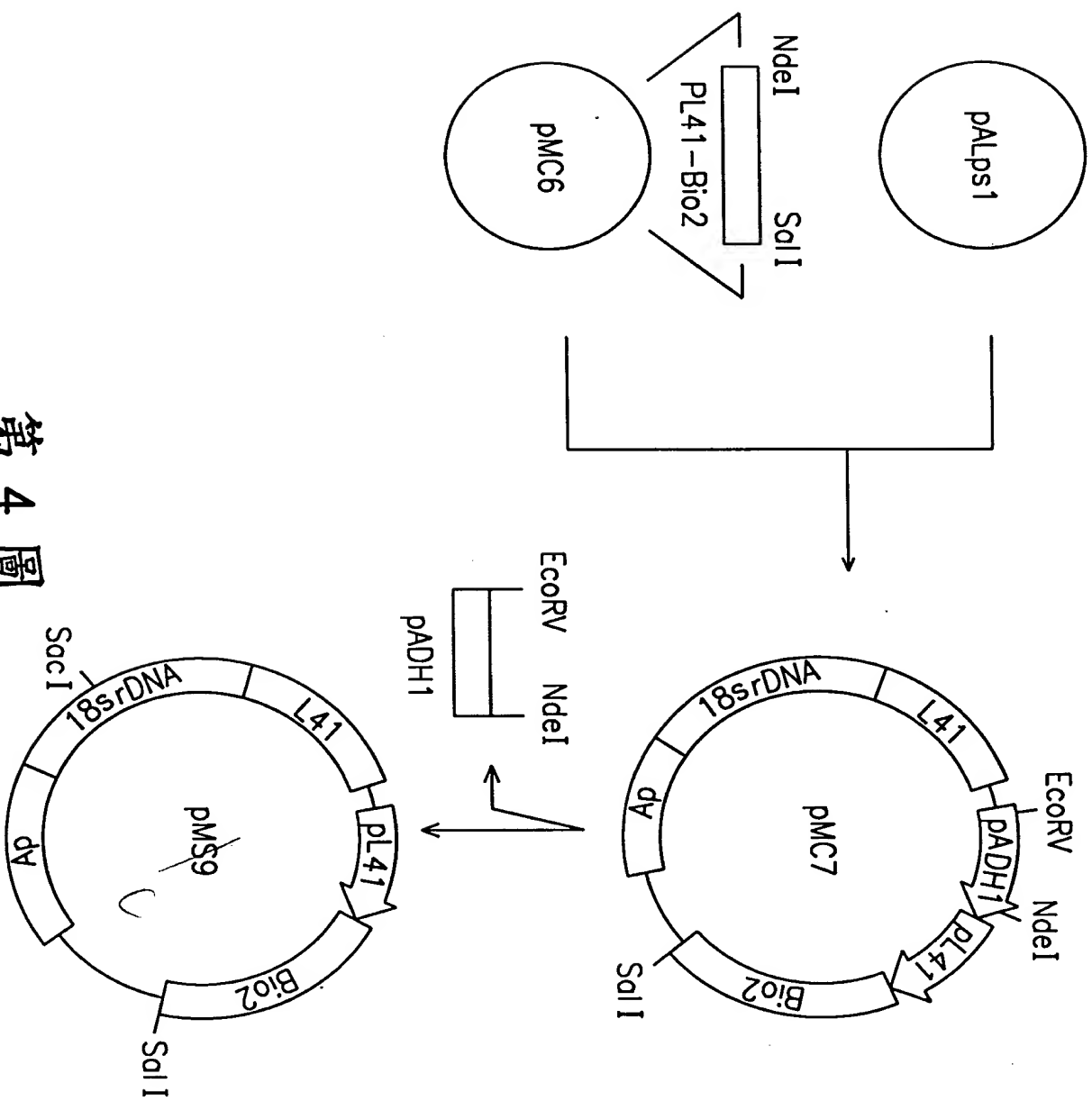
第 1 圖



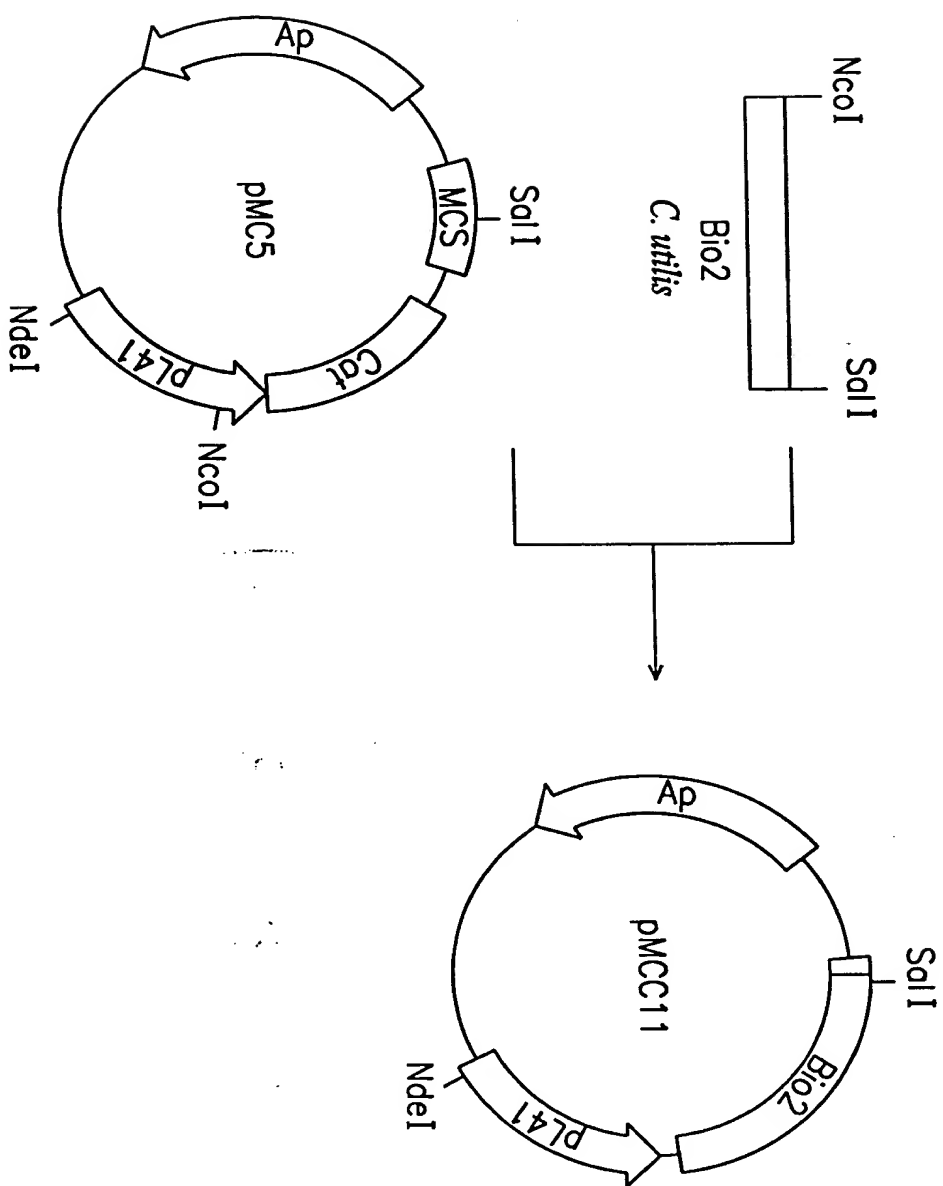
第 2 圖



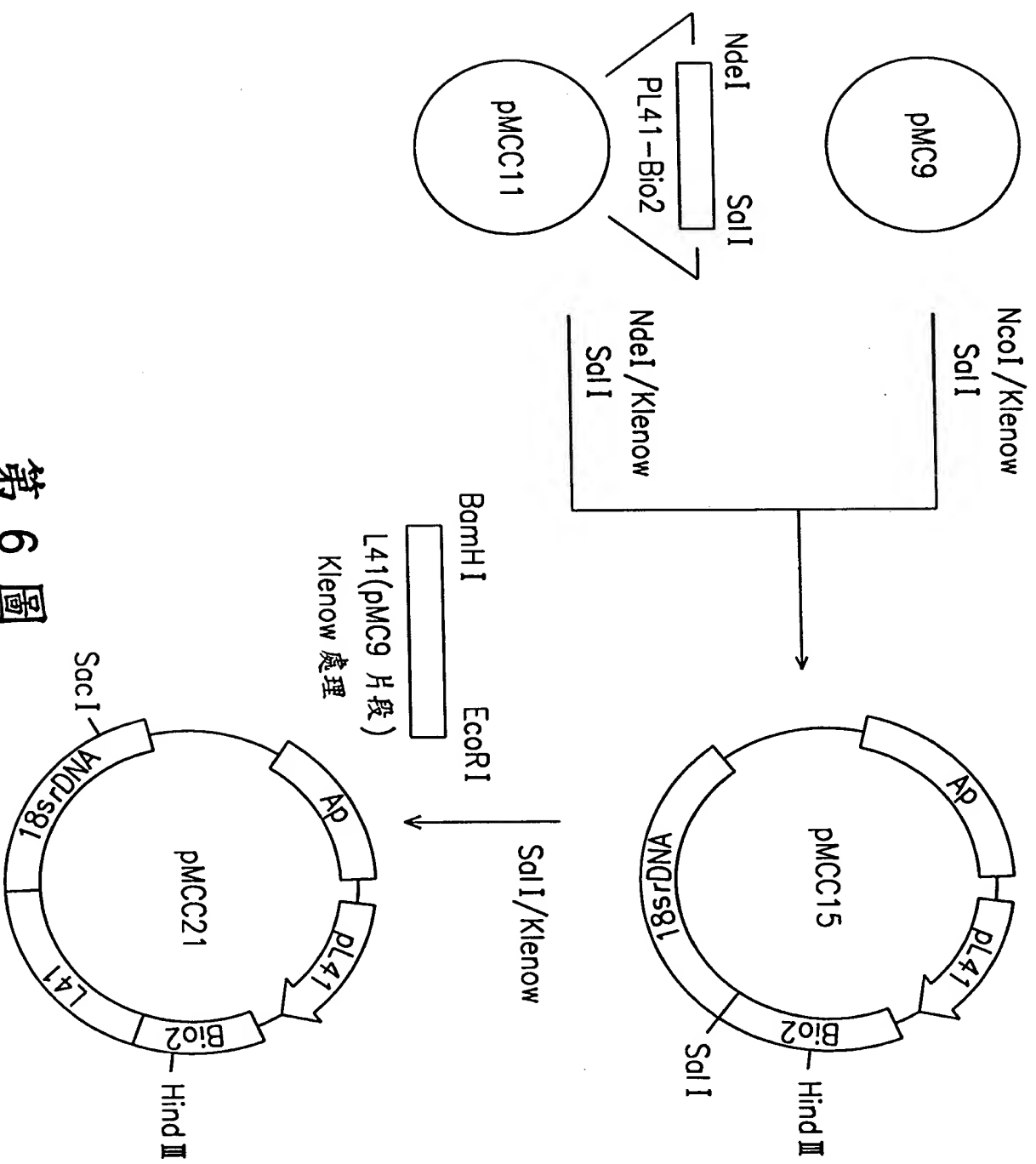
第 3 圖



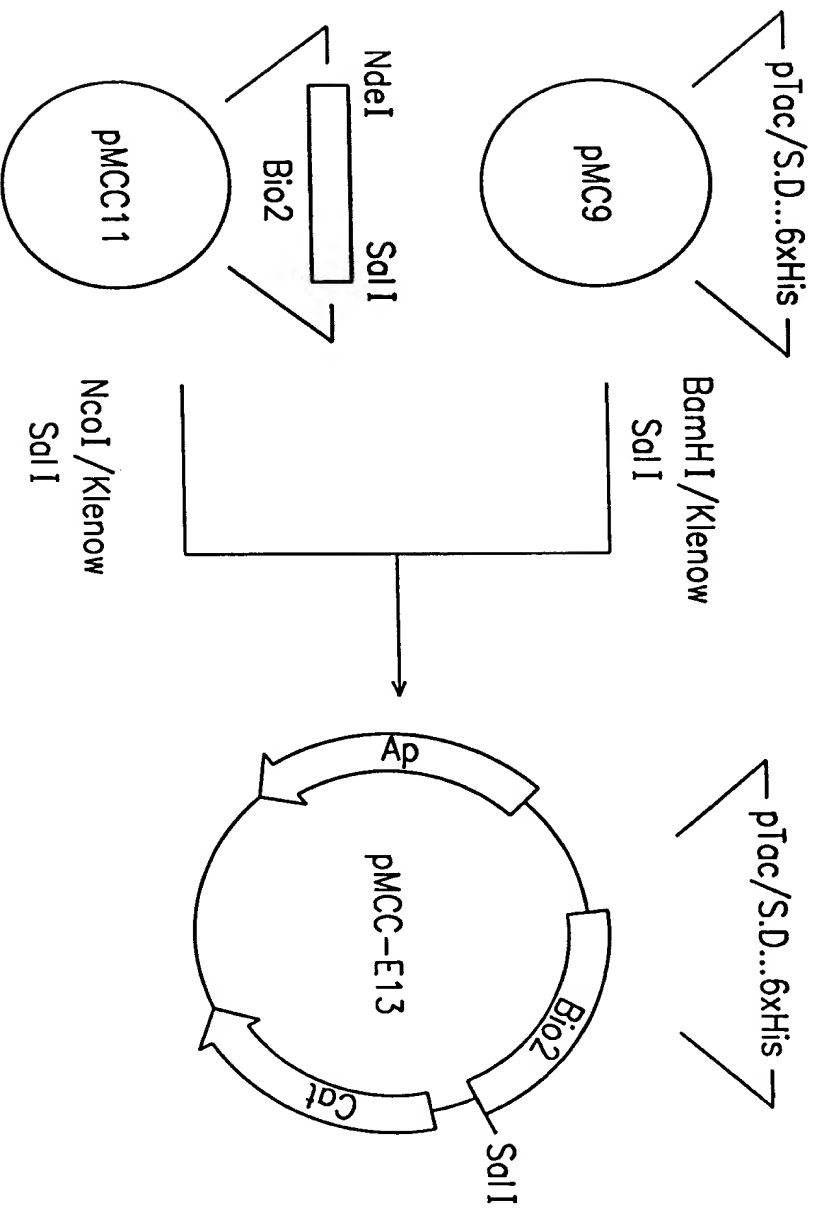
第 4 圖



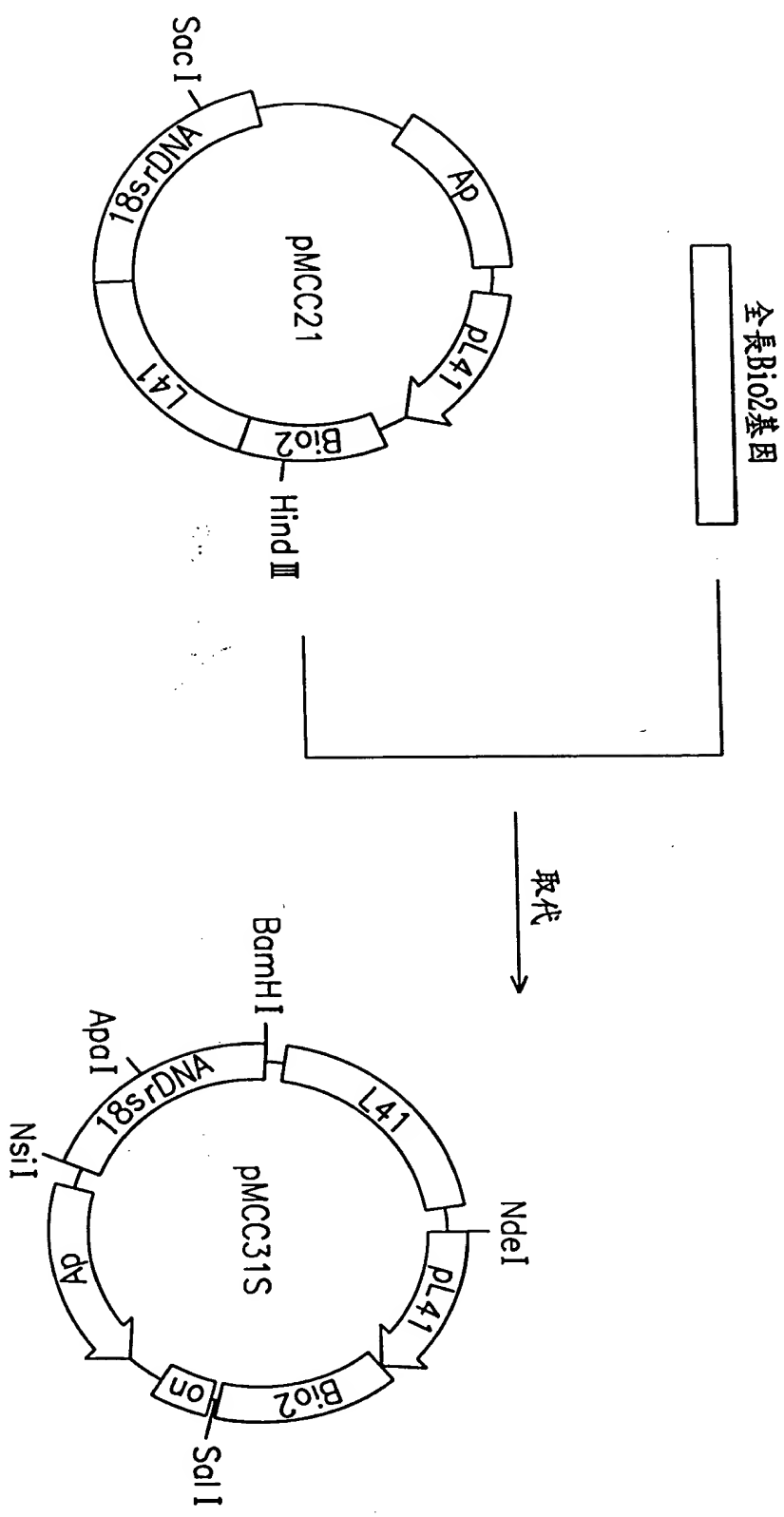
第 5 圖



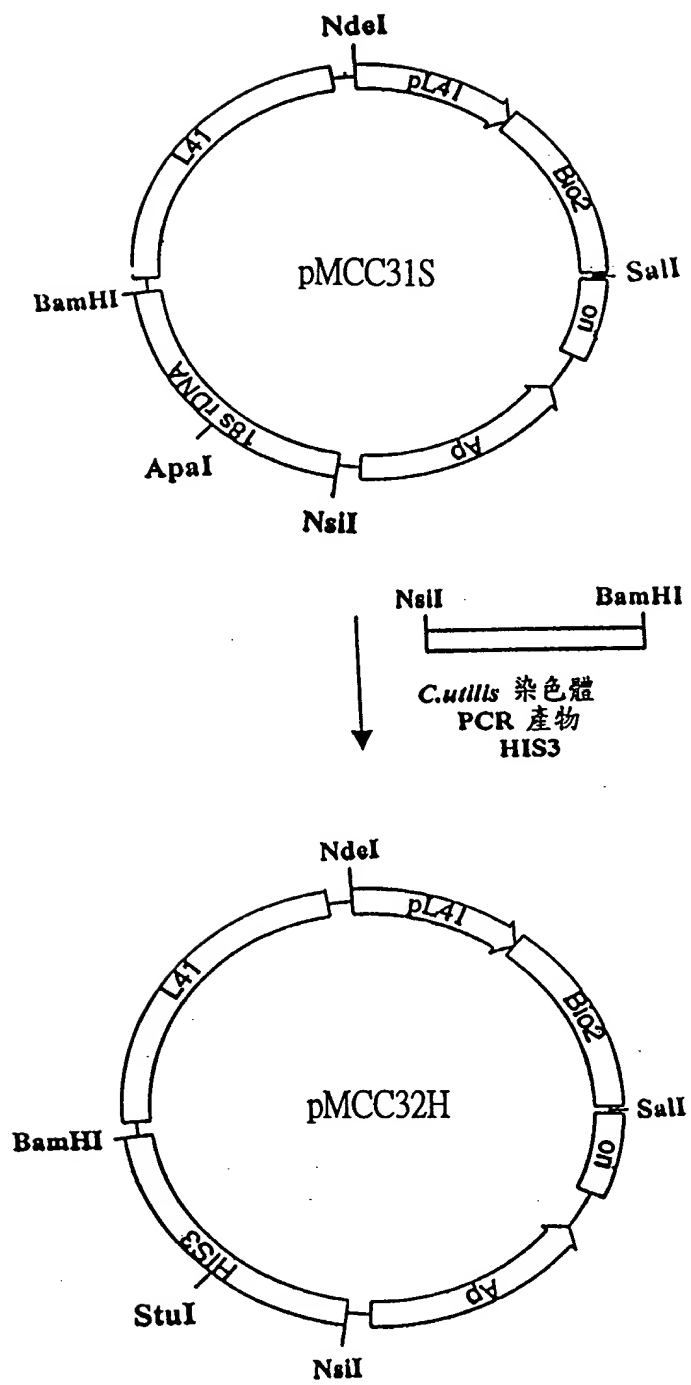
第 6 圖



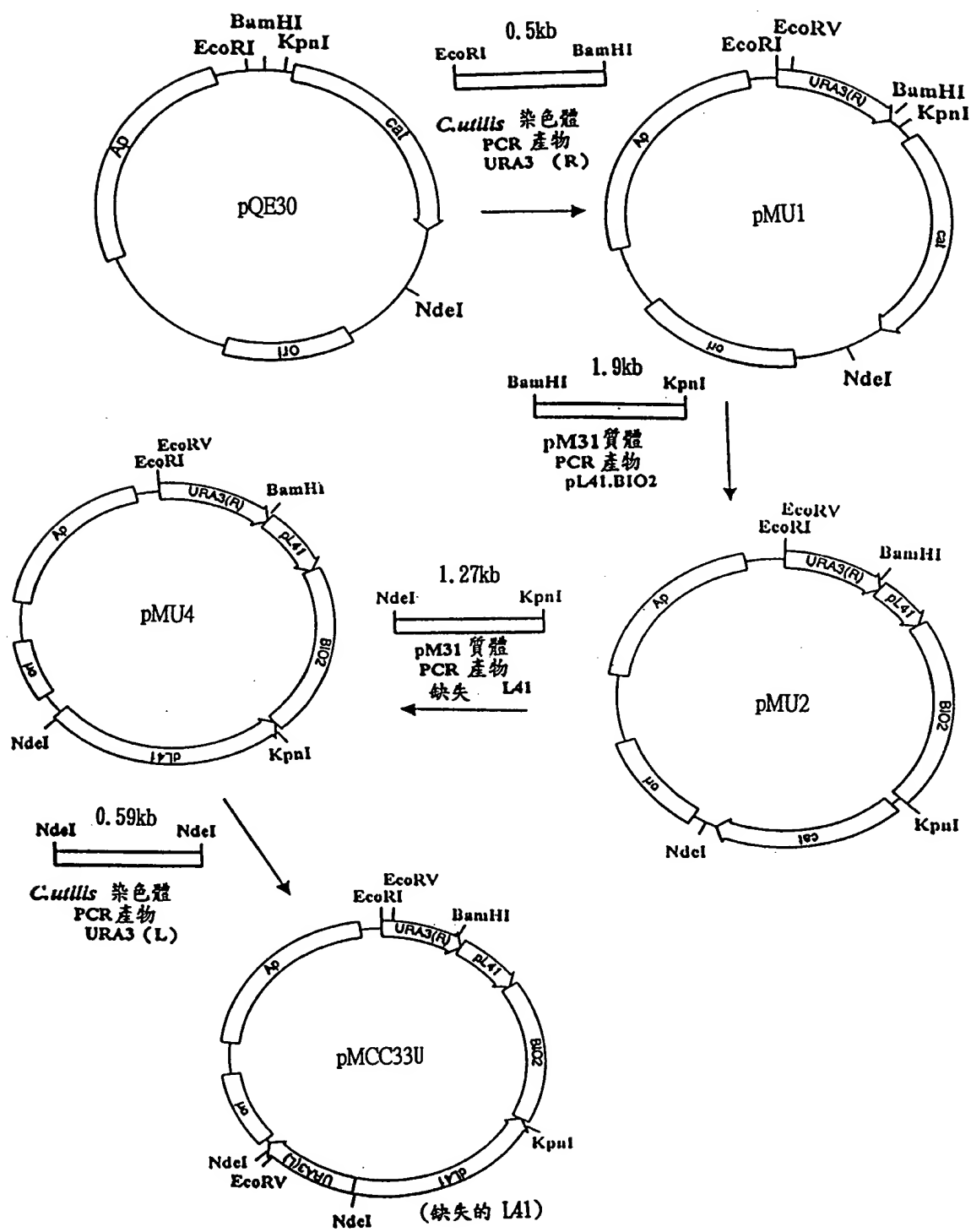
第 7 圖



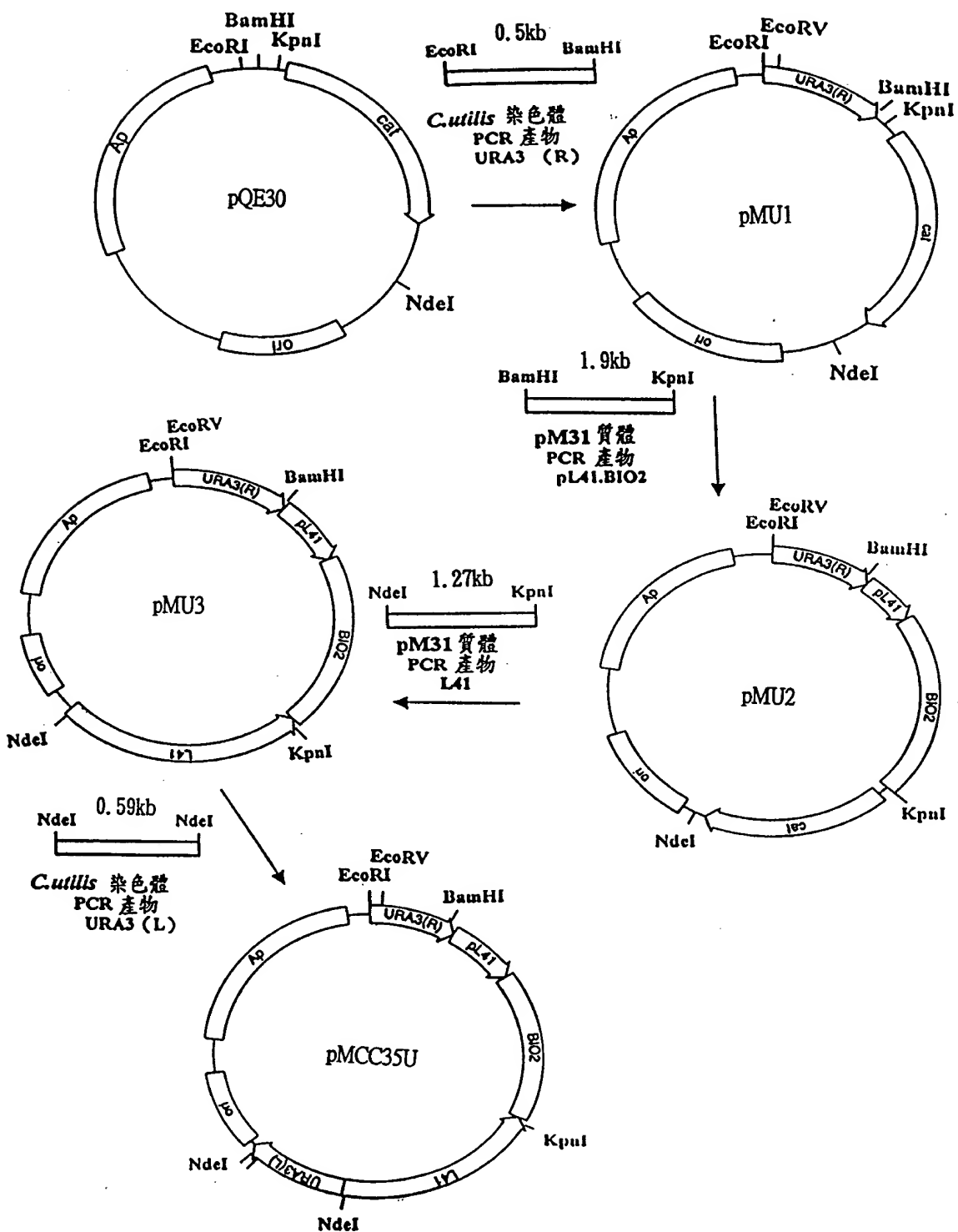
第 8 圖



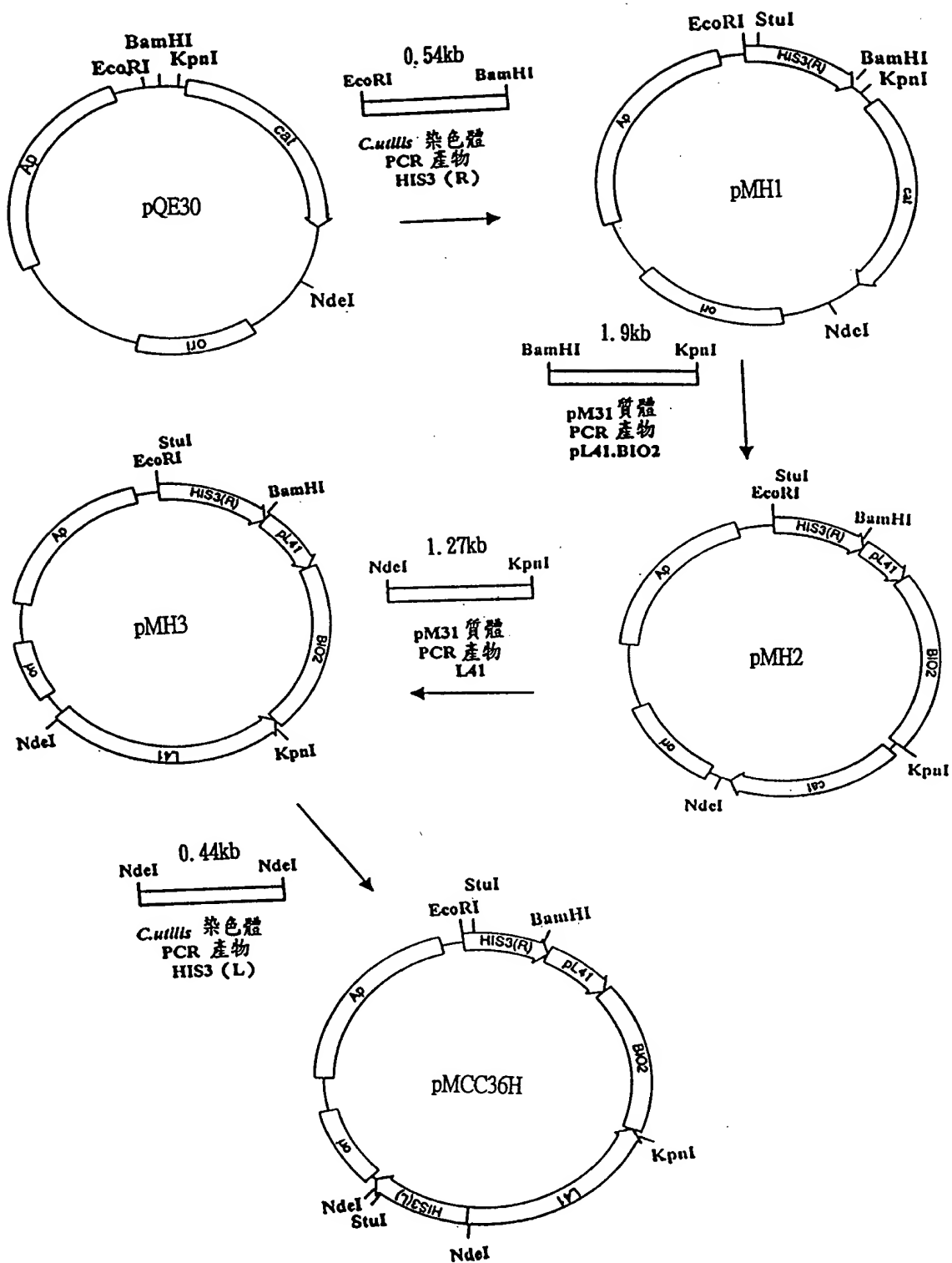
第 9 圖



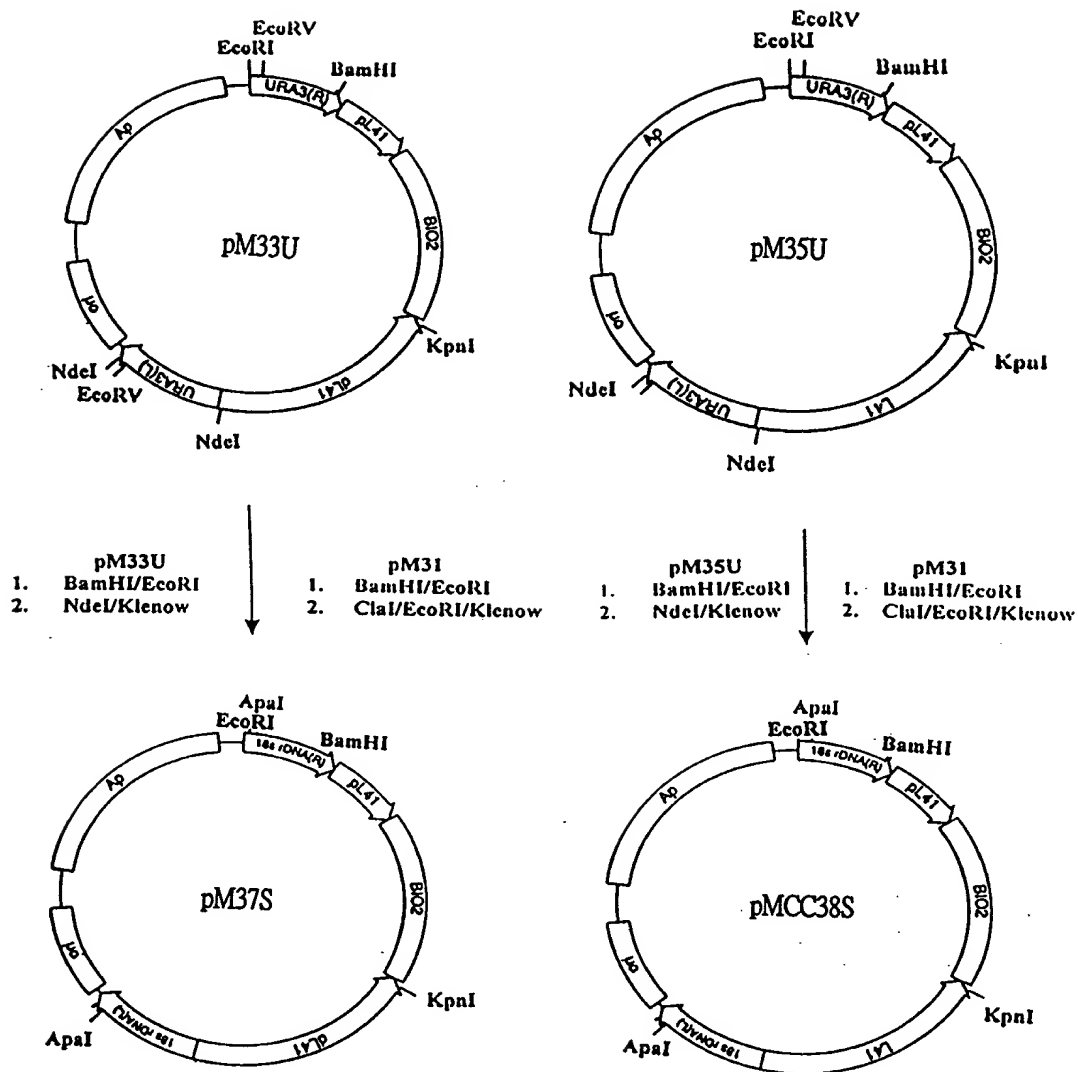
第10圖



第11圖



第 12 圖



第 13 圖

第 1/23 頁



第 2/23 頁



第 3/23 頁



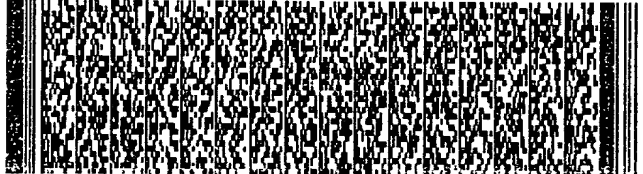
第 4/23 頁



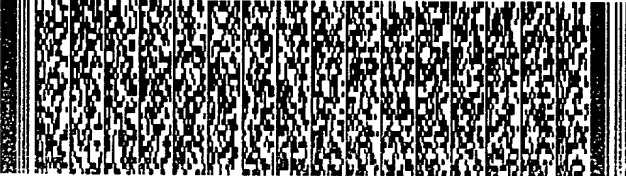
第 4/23 頁



第 5/23 頁



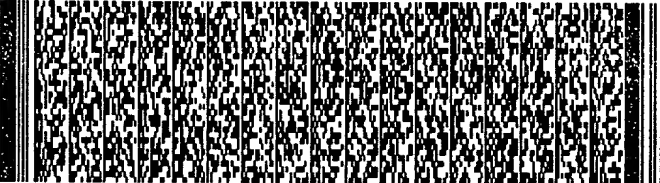
第 5/23 頁



第 6/23 頁



第 6/23 頁



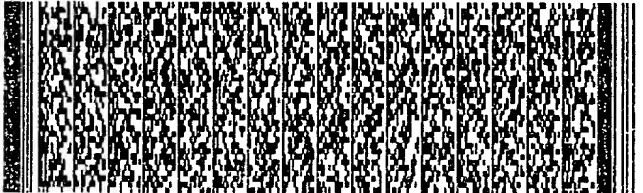
第 7/23 頁



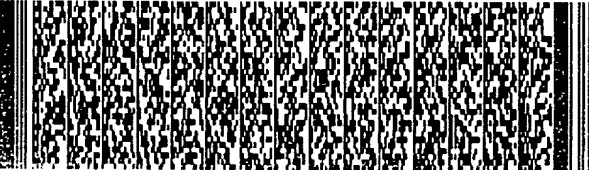
第 7/23 頁



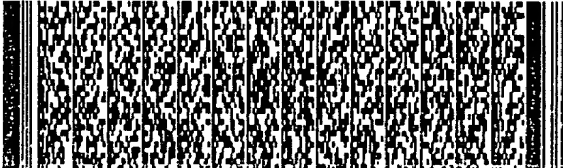
第 8/23 頁



第 9/23 頁



第 10/23 頁



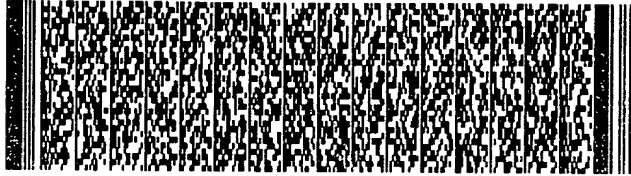
第 10/23 頁



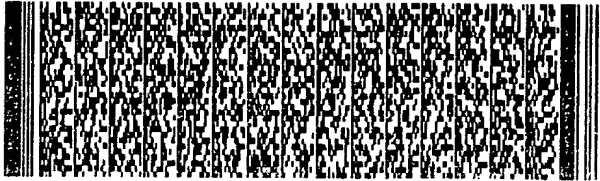
第 11/23 頁



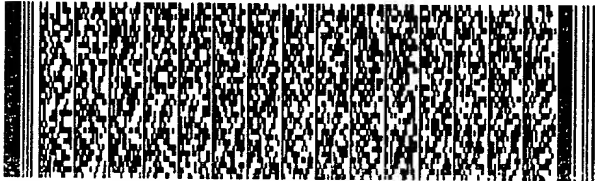
第 11/23 頁



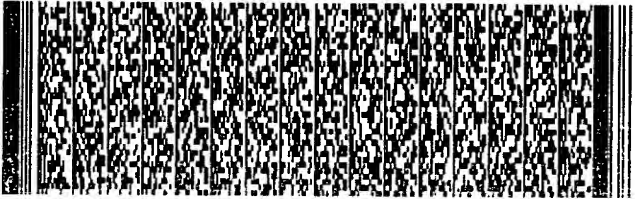
第 12/23 頁



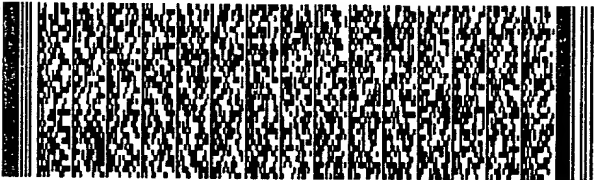
第 12/23 頁



第 13/23 頁



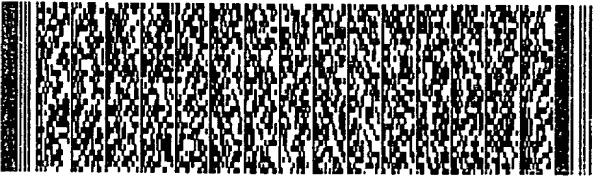
第 14/23 頁



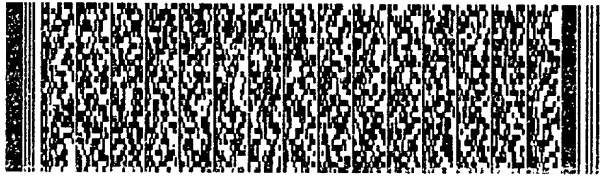
第 14/23 頁



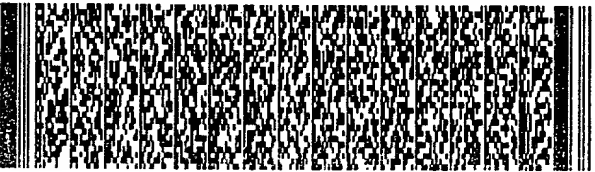
第 15/23 頁



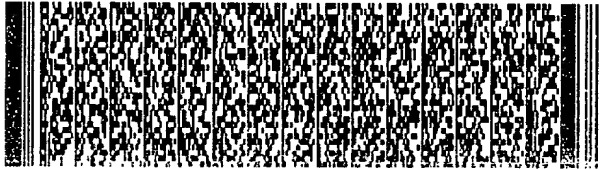
第 15/23 頁



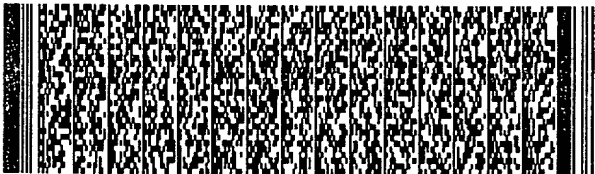
第 16/23 頁



第 16/23 頁



第 17/23 頁



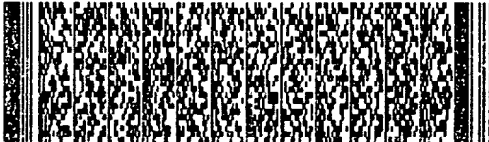
第 17/23 頁



第 18/23 頁



第 19/23 頁



第 20/23 頁



第 21/23 頁



第 22/23 頁



第 22/23 頁



第 23/23 頁

